

山梨県若手研究者奨励事業 研究成果概要書

所属機関名 山梨大学大学院総合研究部医学域皮膚科学講座

職名・氏名 木下 真直 印

1 研究テーマ

好中球関連皮膚疾患における疾患横断的トランスクリプトーム解析と病態解明

2 研究の目的

好中球関連皮膚疾患は、好中球の無菌性浸潤を特徴とする炎症性皮膚疾患群であり、スティーヴンス・ジョンソン症候群(SJS)、尋常性乾癬(PsO)、膿疱性乾癬、掌蹠膿疱症、急性汎発性発疹性膿疱症、壞疽性膿皮症、Sweet病、化膿性汗腺炎などがあるが、各々の病態は多様である。

SJSでは表皮細胞死が起こり、全身の皮膚糜爛(びらん)や結膜炎を呈する。急速に全身の皮膚が剥けるため、ショックや敗血症となり、致死率は5~30%と高い。さらに失明などの後遺症を残すことが多い。

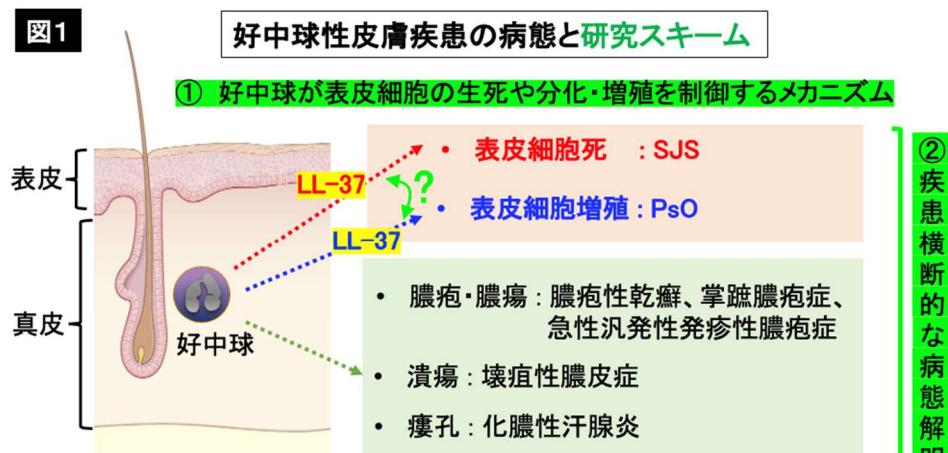
一方、PsOは表皮細胞が増殖し、全身に角化性局面が広がる。生命予後は良いが、患者の生活の質を著しく低下させる。

また、膿疱性乾癬、掌蹠膿疱症、急性汎発性発疹性膿疱症では、好中球が皮膚に浸潤することで、膿疱や膿瘍を形成する。さらに、Sweet病、壞疽性膿皮症、化膿性汗腺炎は好中球が主に真皮や毛包周囲に浸潤し、潰瘍や瘻孔などを形成する。

このように好中球浸潤は多彩な病態と臨床像を呈するが、好中球の病態意義は十分に解明されていない。

我々は、SJSにおいて、好中球が皮膚に浸潤し、抗菌ペプチド LL-37 を放出することで表皮細胞“死”を誘導することを明らかにした(図1赤字、Kinoshita *et al.*, *Science Translational Medicine*, 2021)。

図1



同じく好中球が浸潤及び、LL-37を含む抗菌ペプチドを高発現するPsOでは表皮細胞“増殖”が亢進する(図1青字、Takahashi *et al.*, *Int J Mol Sci*, 2020)。SJSとPsOは共に好中球浸潤と抗菌ペプチドの高発現を認めるにも関わらず、表皮において対照的な病態を示すことは、表皮細胞固有の変化に加え、好中球が表皮細胞の生死や機能をダイナミックに制御している可能性を示唆する。

本研究は、最新のオミックス技術であるシングルセルRNAシーケンス(scRNA seq)を用い、各種好中球関連皮膚疾患で好中球が異なる病変を形成する機構を明らかにすることを目的とする。

3 研究の方法

留意事項

① 3枚程度で作成してください。

② 特許の出願中等の理由により、一定期間公表を見合わせる必要がある箇所がある場合であっても、所定の期日までに公表可能な範囲で作成・提出してください。当該箇所については、後日公表可能となった際に追記して再提出してください。

A. SJS と PsO において、好中球が表皮細胞の生死や機能を制御するメカニズム

- SJS と PsO、その他の好中球性皮膚疾患の血清を用いて、それらが好中球に与える影響を調べる。
- 健常皮膚と PsO による scRNA-seq 解析を用いて、皮膚構成細胞の遺伝子発現変化を網羅的に探索する。
- 好中球が表皮細胞の生死や機能をダイナミックに制御している経路を探索する。

B. 好中球関連皮膚疾患の疾患横断的な病態理解

- 好中球関連皮膚疾患(膿疱性乾癬、掌蹠膿疱症、急性汎発性発疹性膿疱症、Sweet 病、壞疽性膿皮症、化膿性汗腺炎)の病変部を scRNA-seq 解析し、各皮膚構成細胞におけるトランскルiptーム変化を網羅的に探索する。

4 研究の成果**A. PsO と SJS における皮膚への好中球の遊走プロセス**

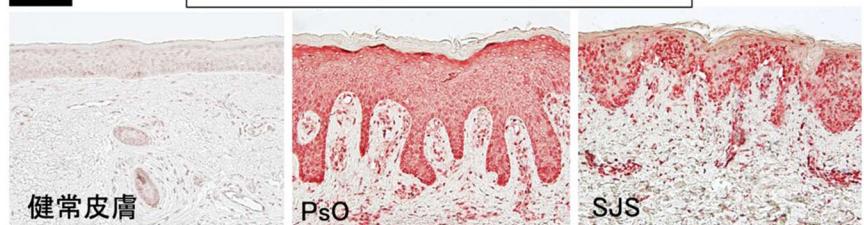
好中球関連皮膚疾患において、好中球は、

- ① 血中から間質への経内皮遊走
- ② 好中球ケモカインに起因した皮膚への遊走

の 2 つのステップにより皮膚に浸潤していく。

我々は、上記②のステップに関して、好中球ケモカインである IL-8, CXCL1, CXCL2 が PsO, SJS の表皮で強く発現することを明らかにした(図2)。

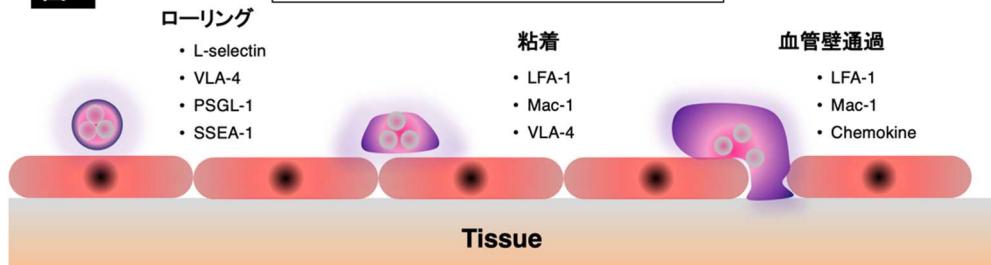
図2 PsO, SJS の表皮は IL-8 を強く発現する



上記①のステップである血中から間質への経内皮遊走機序が、PsO や SJS でどのように変化しているか、未だ不明である。好中球は経内皮遊走シグナルに遭遇すると、L-selectin などの接着分子によりローリングが阻害され、LFA-1 などによる粘着、血

管壁通過を経て血管外に遊走する(図3)ため、これら分子の発現パターンをプロファイリングし、好中球の血管外遊走のプロセスを解析中である。

図3 好中球の血管外遊走に関わる主な分子

**B. SJS における好中球の Neutrophil extracellular traps (NETs) 形成**

我々は、これまで SJS 病変部に浸潤する好中球は Neutrophil extracellular traps (NETs) を形成していることを報告している (Kinoshita *et al.*, *Science Translational Medicine*, 2021)。

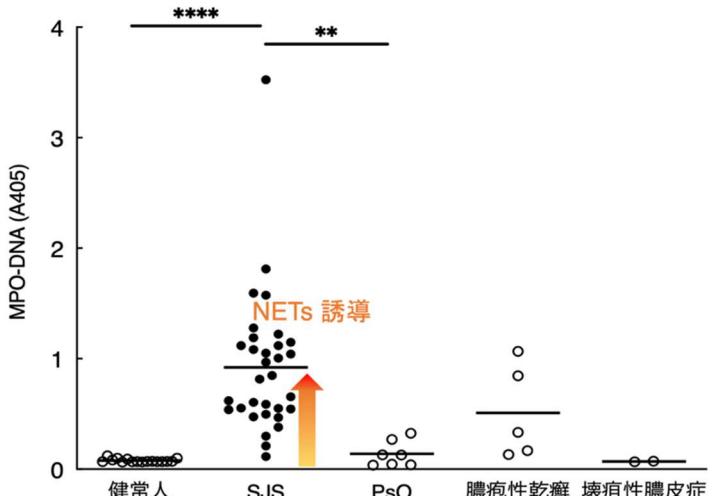
留意事項

- ① 3 枚程度で作成してください。
- ② 特許の出願中等の理由により、一定期間公表を見合わせる必要がある箇所がある場合であっても、所定の期日までに公表可能な範囲で作成・提出してください。当該箇所については、後日公表可能となった際に追記して再提出してください。

各種好中球性皮膚疾患における好中球の性情の違いを明確にするため、好中球性皮膚疾患の患者血清で刺激した好中球が放出する MPO-DNA 複合体で NETs を評価した。すると、NETs 形成は SJS で特徴的であり、PsO、膿疱性乾癬、壞疽性膿皮症では顕著でなかった(図4)。

図4

患者血清による NETs 誘導
(好中球上清中 MPO-DNA 複合体濃度)



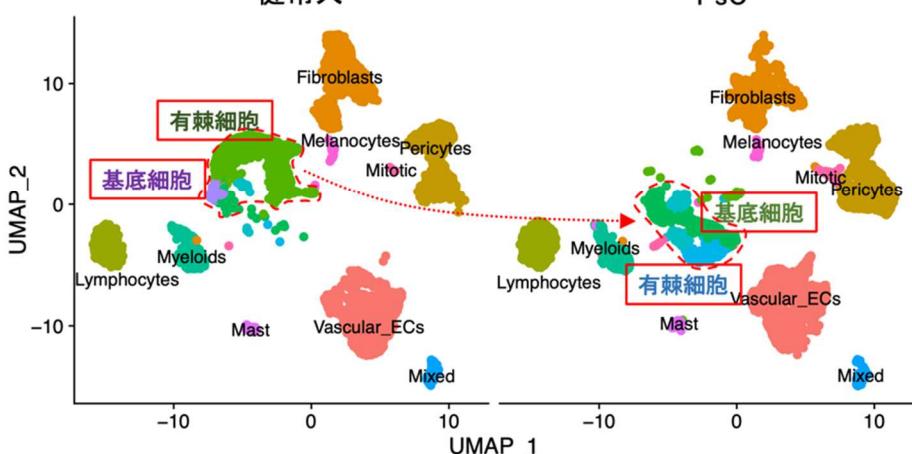
C. PsO における好中球を主体とした病態

好中球は SJS 特異的に NETs を形成し、PsO ではほとんど形成されないことを明らかにした(図4)。PsO と SJS の表皮細胞はそれぞれ、増殖と細胞死という対照的な状態を呈する。そこで好中球が PsO 表皮細胞に与える影響(好中球が表皮細胞の生死や機能をダイナミックに制御している経路)を探索するため、健常皮膚と PsO に皮膚病変に scRNA-seq を実行し、比較した。

すると表皮細胞(有棘細胞、基底細胞)のクラスターは健常皮膚と PsO 皮膚で大きく変移していた(図5)。

図5

PsO の表皮細胞クラスターは健常人と著しく異なる



さらに、PsO の表皮細胞で亢進している Pathway は表皮細胞分化や、抗菌ペプチドなど自然免疫に関わる遺伝子群、細胞死に関わる遺伝子群が特に亢進していた(図6)。

すなわち、PsO では表皮細胞分化や細胞死に関わる表皮細胞固有の遺伝子変化に富んでいる。これは、PsO に特異的な細胞増殖を規定する要因の一つと考えられる。

図6

PsO の表皮細胞で亢進する Pathway

keratinocyte differentiation

response to bacterium

innate immune response

Antimicrobial peptides

regulation of apoptotic signaling pathway



5 今後の展望

A: 科学的発展性

疾患ごとの根底にある好中球の成熟度(成熟好中球、低密度好中球などのサブセット)や異質性・エフェクタ

留意事項

① 3枚程度で作成してください。

②特許の出願中等の理由により、一定期間公表を見合わせる必要がある箇所がある場合であっても、所定の期日までに公表可能な範囲で作成・提出してください。当該箇所については、後日公表可能となった際に追記して再提出してください。

一機能(脱颗粒、活性酸素種(ROS)放出、食作用、NETs など)について、さらなる検討が必要であり、SJS を含むその他の好中球関連皮膚疾患を疾患横断的に scRNA-seq 解析を行う。各疾患特異的な好中球の異質性が、他の細胞群に与える影響を明らかにすべく scRNA-seq における CellChat アルゴリズムを用いて、疾患ごとの細胞間コミュニケーションの変化を探索する。それら疾患特異的な細胞間シグナルから、好中球が他の細胞(表皮細胞、血管内皮細胞、線維芽細胞など)の DEGs に与える経路を抽出する。とくに好中球が表皮細胞の生死や機能をダイナミックに制御しているシグナルを探索する。

次に、*in vitro* で疾患特異的な好中球の分化状態や、低密度好中球を分離、誘導する。その好中球を表皮細胞株(normal human epidermal keratinocytes)や、血管内皮細胞株、線維芽細胞株と共に培養した際の表皮細胞、血管内皮細胞、線維芽細胞における遺伝子、蛋白発現の変化を RT-PCR 法や免疫組織染色、ウエスタン・ブロッティング法により検討することで、scRNA-seq で観察された遺伝子発現変化が好中球による直接作用であるか検証し、好中球の病態意義を明確にする。

B: 他分野への発展性

今では、オミックス解析が生命科学研究における標準手法となり、多くの研究室で必要とされている。今回山梨大学において初めて確立する技術を活用し、神経薬理学(医学部薬理学講座 小泉修一教授)、免疫領域(医学部免疫学講座 中尾篤人教授)など学内他領域の研究者と共同研究を予定している。さらに山梨大学内に限らず、県内の他大学との融合研究へと拡大する予定である。

6 研究成果の発信方法(予定を含む)

以下を通じて、アカデミアでの成果発表と一般市民への研究公表、疾患の啓蒙を行っていく。

- 学会発表・学術論文を通して世界で高く評価される研究を目指す
- 広報や新聞、テレビ、ラジオを通した一般市民への皮膚疾患の啓蒙
里仁会広報
山梨日日新聞、産経新聞、FM-FUJI、UTY スゴロク、
2024/ 産経新聞、山梨日日新聞 クラウドファンディングの紹介
2024/ FM FUJI: クラウドファンディングの紹介
2024/10/7 ナシダイブ ライフサイエンスコースの OB として
2024/11/27 UTY スゴロク クラウドファンディングの紹介
- クラウドファンディングを通して研究成果の公表と研究助成の公募
(「ミュージック・セキュリティーズ」、「山梨大学医学部教育研究基金」にて運用中)

留意事項

- ① 3枚程度で作成してください。
- ②特許の出願中等の理由により、一定期間公表を見合わせる必要がある箇所がある場合であっても、所定の期日までに公表可能な範囲で作成・提出してください。当該箇所については、後日公表可能となった際に追記して再提出してください。